



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Título

Bacterias detectadas en el interior de la cámara genital de
Macroductylus mexicanus (Coleoptera: Melolonthidae) y su posible
participación en la producción de atrayentes

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Francisco Javier Pérez Estrada

Director

Angel Alonso Romero López



Noviembre, 2020

Agradecimientos

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico aportado en el transcurso de mis estudios con el número de becario **713460** sin el cual, este trabajo no hubiera sido posible.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por el espacio y apoyo para poder concluir el trabajo de tesis y permitirme realizar los estudios en la Maestría en Ciencias Biológicas (PNPC: De reciente creación).

A la M. en C. María del Rosete Enríquez, al brindarme un espacio para poder realizar los experimentos y ser parte fundamental para el desarrollo de la tesis. Muchas gracias profa.

Al Dr. Gonzalo Yanes Gómez, por su importante revisión al escrito de tesis y estar en el jurado del examen. Gracias doctor.

Al Dr. José Antonio Rivera Tapia, debido a su valioso apoyo con el trabajo de laboratorio y por las importantes sugerencias hacia el escrito de tesis.

Al Dr. José Lino Zumaquero Ríos, por todas sus apreciadas sugerencias a lo largo del escrito de tesis y por todo el apoyo moral.

Alice, Fernanda, Gabriela, Pamela, Xóchilt, Yamil y Zaira, amigos del laboratorio, quienes estuvieron en todo el momento de la maestría y ayudaron de cierta manera. Gracias, amigos.

A Martha Raquel Trujillo Vélez quien me dio todas las esperanzas de continuar con un posgrado y ser la fuente de inspiración en todo lo que hago en la vida. Muchas gracias.

Un especial agradecimiento a mi tutor, mentor y amigo Angel Alonso Romero López, por toda la cofinancia que depositó en mí, por enseñarme a ser una mejor persona e investigador, así como demostrarme que debemos ser mejores cada día en lo que uno hace, por ser precavidos en cada situación y ser la única persona que aceptaría alumnos como yo, a fin de transformarlos en algo mejor. Te estoy eternamente agradecido “jefe”.

Finalmente agradezco a mis padres y hermanos que estuvieron pendientes de mi en el transcurso de mis estudios con la aportación de su cariño, esfuerzo y esperanzas.



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Declaratoria de trabajo original

Con base al Reglamento de Estudios de Posgrado y el Código de Ética de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, declaramos que el trabajo titulado “**Bacterias detectadas en el interior de la cámara genital de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y su posible participación en la producción de atrayentes**” es de total responsabilidad del tutor **Dr. Angel Alonso Romero López** y del alumno **Francisco Javier Pérez Estrada**. El trabajo remitido es un documento original y no ha sido publicado con anterioridad, total o parcialmente, por otros autores. Los datos presentados en el documento no se han utilizado para realizar otro grado académico dentro o fuera del país. Los autores son públicamente responsables de su contenido y elaboración, y que no ha incurrido en fraude científico o plagio. Si se demostrara lo contrario, los autores aceptarán las medidas disciplinarias o sancionadoras que correspondan.

ATENTAMENTE

H. Puebla de Z. a 28 de octubre de 2020

Alumno
Francisco Javier Pérez Estrada

Director de Tesis
Dr. Angel Alonso Romero López



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 16 de noviembre de 2020

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

"Bacterias detectadas en el interior de la cámara genital de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y su posible participación en la producción de atrayentes"

Que presenta el estudiante Francisco Javier Pérez Estrada con número de matrícula 218470584, aspirante al grado de Maestro en Ciencias Biológicas, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: "Ecología y Aprovechamiento de Recursos Bióticos", notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los VOTOS APROBATORIOS como miembros del Comité de Jurado de Examen de Grado como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dr. Angel Alonso Romero López

Revisor: Dr. Gonzalo Yanes Gómez

Revisor: Dr. José Antonio Rivera Tapia

Revisor: Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Índice general

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
1. Generalidades sobre volátiles producidos por microorganismos	3
2. Microorganismos productores de volátiles asociados a insectos	3
3. Técnicas de extracción e identificación de volátiles microbianos	5
4. Ecología química de coléopteros Melolonthidae.....	6
Características morfológicas y hábitos	6
Esquemas de comunicación química	8
Ensayos de confirmación de actividad biológica.....	10
Estudio del comportamiento	11
5. Comunicación química de integrantes del género <i>Macroductylus</i>	12
Generalidades morfológicas y hábitos	12
Anatomía del aparato reproductor de hembras de <i>Macroductylus</i> relacionadas con su comunicación química	13

6. <i>Macroductylus mexicanus</i> Burmeister como modelo de estudio	15
7. Microorganismos asociados con el aparato reproductor de hembras de Melolonthidae y posibles implicaciones químico-ecológicas.....	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares.....	19
Material y métodos.....	20
Captura de adultos de <i>M. mexicanus</i>	20
Nota ética.....	21
Estudio microbiológico.....	21
Bioensayos de confirmación de actividad biológica	22
Diseño experimental	22
Pruebas en olfatómetro	23
Análisis de datos	25
Registro del comportamiento insecto-extracto bacteriano	25

Resultados	25
Estudio microbiológico.....	25
Bioensayos.....	26
.....	27
Registro del comportamiento de machos de <i>M. mexicanus</i> hacia los extractos bacterianos	28
Discusión.....	32
Estudio microbiológico.....	32
Olfatómetro.....	34
Bioensayos.....	35
Conclusiones	38
Literatura citada.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de comunicación química sexual de la familia Melolonthidae.	10
Figura 2. Esquema general del aparato reproductor de los integrantes de la familia Melolonthidae (<i>M. mexicanus</i>)	14
Figura 3. Imagen de la hembra de <i>Macroductylus mexicanus</i> (Burmeister).....	16
Figura 4. Olfatómetro de vidrio de cuatro vías.	24
Figura 5. Sembrado de bacterias obtenidas en la cámara genital de <i>Macroductylus mexicanus</i> en medio LB sólido	26
Figura 6. Imágenes de los bioensayos con machos de <i>M. mexicanus</i>	27
Figura 7. Bioensayos en olfatómetro donde se evidencian las respuestas positivas de machos de <i>Macroductylus mexicanus</i> (Bac.mex) hacia los extractos bacterianos de <i>M. mexicanus</i>	27
Figura 8. Bioensayos en olfatómetro de las respuestas positivas de machos de <i>M. mexicanus</i> (Bac.mex) hacia los extractos bacterianos de <i>M. mexicanus</i> y los extractos bacterianos de <i>Phyllophaga ravidia</i>	28
Figura 9. Etograma de machos de <i>Macroductylus mexicanus</i> hacia los volátiles bacterianos.	31

Índice de cuadros

Cuadro 1. Repertorio de patrones de comportamiento registrados en los machos de <i>Macroedactylus mexicanus</i>	29
Cuadro 2. Repertorio de transiciones del comportamiento registrados por parte de los machos de <i>Macroedactylus mexicanus</i>	30

Resumen

Se sabe que las hembras de *Macroductylus mexicanus* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae) cuentan con epitelios especializados en la producción de feromonas, los cuales se localizan en la cámara genital y en las glándulas accesorias. No obstante, se requiere de información acerca de los microorganismos asociados a dichas estructuras, como se ha evidenciado en otras especies de la familia. Para confirmar la presencia de estos y su posible participación en la producción de feromonas, en este trabajo se extrajeron muestras del interior de la cámara genital y glándulas accesorias de hembras de *M. mexicanus*. Se detectó un tipo de colonia bacteriana en la cámara genital de *M. mexicanus* con un color rosa-crema y tamaño de 1-2 mm de diámetro. Para confirmar la actividad biológica de las bacterias aisladas, se llevaron a cabo bioensayos de laboratorio en olfatómetro de cuatro vías, con lo cual se evaluó la respuesta de adultos de *M. mexicanus* hacia los extractos de dichos microorganismos y otros estímulos. Se observó que las hembras de este grupo de insectos muestran taxias positivas estadísticamente significativas hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus* con respecto a las respuestas de estos insectos hacia el control ($p < 0.001$). Los resultados generados en el presente estudio permiten sugerir que las bacterias alojadas en la cámara genital de las hembras de esta especie están relacionadas con la producción de atrayentes específicos.

Introducción

En hembras de coleópteros Melolonthidae se han localizado epitelios especializados en la producción de feromonas sexuales, específicamente en esternitos abdominales, cámara genital y glándulas accesorias. Esto ha sido documentado principalmente para especies de los géneros *Anomala* (Tada y Leal, 1997), *Holotrichia* (Kim y Leal, 1999), *Phyllophaga* (Romero-López *et al.*, 2010; Romero-López *et al.*, 2011), *Macroductylus* (Benítez-Herrera *et al.*, 2015) y *Cyclocephala* (Benítez-Herrera, 2018). De forma complementaria, se han aislado e identificado microorganismos del interior de las glándulas accesorias y de la cámara genital de especies de Melolonthidae distribuidas en Nueva Zelanda (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016) y en México (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017), los cuales se sugiere podrían también estar involucrados en ello.

Con la finalidad de obtener más información sobre la asociación de estos microorganismos con los coleópteros Melolonthidae, se han iniciado estudios con especies de importancia económica en México, como es el caso de los integrantes de *Macroductylus* (Arce-Pérez y Morón, 2000). Además del interés por complementar el esquema de comunicación química de los miembros de este género, se abren perspectivas para implementar acciones de manejo de insectos plaga basadas en feromonas sexuales, en particular, originadas de la actividad bacteriana. En el presente trabajo se propone el abordar estos tópicos con el estudio de *Macroductylus mexicanus* Burmeister con la búsqueda de microorganismos en estructuras específicas del aparato reproductor de hembras de esta especie y la evaluación de las quimiotaxias por parte de los machos hacia productos que pudieran estar liberando dichos microorganismos.

Antecedentes

1. Generalidades sobre volátiles producidos por microorganismos

Los microorganismos tienen la capacidad de producir compuestos químicos volátiles derivados de su metabolismo (Leroy *et al.*, 2011). Algunos de los compuestos liberados por estos organismos detonan el establecimiento de interacciones con otros seres, destacando aquellas como las evidenciadas por insectos del género *Glossina* (Diptera: Muscidae), los cuales son atraídos por el compuesto 1-octen-3-ol liberado por algunos hongos. Otro ejemplo es el de *Enterobacter agglomerans* al liberar volátiles derivados de alcoholes y cetonas que provocan un aumento en la oviposición de las moscas de *Rhagoletis pomonella* Walsh o el de los volátiles liberados por el hongo *Botrytis cinerea* que evitan que los individuos de *Lobesia botrana* Denis and Schiffermüller se acerquen al hospedero y ovipositen sobre este (Davis *et al.*, 2013). Estos trabajos dan la importancia de los productos volátiles liberados por microorganismos al dar datos empíricos de cómo pueden modificar su comportamiento en beneficio de los insectos.

2. Microorganismos productores de volátiles asociados a insectos

Los microorganismos establecen fuertes relaciones con los insectos, por lo que se pueden encontrar interacciones simbióticas y patógenas en la naturaleza (Eberhard, 1992; Thao y Baumann, 2004; French-Constant *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019). Dentro de las relaciones microbio y otros seres, se pueden destacar los involucrados con compuesto volátiles

microbianos (Korpi *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2013) y los cuales, pueden interactuar con insectos, más específicamente alterando su comportamiento (Ezenwa *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2013). Los microorganismos producen los volátiles mediante la degradación de ácidos grasos, aminoácidos aromáticos, o carbohidratos (Schulz y Dickschat, 2007) y se han registrado volátiles derivados de azufre, nitrógeno, terpenoides, halógenos, entre otros (Leroy *et al.*, 2011). Insectos como *Anastrepha ludens* (Loew) tienen a modificar su comportamiento con los volátiles (amoníaco, metilamina, 3-metilbutanamina, aminas alifáticas, iminas y pirizinas) que liberan el microorganismo *Staphylococcus aureus*, una vez captado los volátiles microbianos, la mosca procede a localizar el lugar de origen para poder realizar la oviposición (Martínez *et al.* 1994; Robacker y Moreno, 1995). También microorganismos como *Ishikawaella capsulata* son de importancia para el desarrollo de *Megacopta cribraria* (Fabricius), por esta razón los volátiles liberados por estos microorganismos modifican el comportamiento de *M. cribraria* hacia una quimitaxia en dirección a *I. capsulata* para poder obtener la microbiota necesaria para un desarrollo óptimo (Hosokawa *et al.*, 2008). En otros casos, los volátiles microbianos son importantes para determinar el sitio de alimentación por lo que provoca quimitaxias en *Ceratitis capitata* (Wied), *Blaberus discoidalis* (Audinet-Serville) y *Agrochola helvola* (Linnaeus) (Davis *et al.*, 2013). Existen situaciones donde los microorganismos al liberar sus volátiles (*Ogataea pini*) pueden ser interceptadas por insectos y modificar su comportamiento para alejarse (repelencia) de la fuente de emisión, por lo que estos microorganismos son patógenos de una variedad de insectos (Davis *et al.*, 2011). Otros autores mencionan que *Psychrobacter immobilis*, *Sphingobacterium multivorum*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca* producen componentes volátiles que

provocan una respuesta de atracción (quimiotaxis) a los insectos *Diadromus pulchellus* Wesmael (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Culex restuans* Theobald (Diptera: Culicidae), *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), *Bactrocera tryoni* Froggatt (Diptera: Tephritidae) y *Dactrocera cacuminatus* (Diptera: Tephritidae) (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013). Estos ejemplos dan una idea clara del como los microorganismos, con sus volátiles, pueden tener fuertes influencias en el comportamiento de los insectos hasta el punto de modificarlo y desencadenar otro tipo de respuestas.

3. Técnicas de extracción e identificación de volátiles microbianos

Para la recolección e identificación de volátiles *in situ* producidos por cualquier organismo, se utilizan distintos métodos, pero en general constan de cuatro etapas básicas: “headspace”, recolección de volátiles, separación de volátiles y análisis (Torto *et al.*, 2013). El headspace consiste en manipular el aire que rodea la fuente emisora de volátiles para su posterior uso y estos volátiles se recolectan con la colocación de una matriz polimérica, en un sitio donde se encuentre concentrado los volátiles (pasivo) o aplicando un flujo de viento a la fuente emisora (activo). Los volátiles obtenidos en la matriz se separan aplicando calor (desorción térmica) o por disolventes (desorción por disolventes) y al final estos volátiles puedan ingresar al equipo especializado para su posterior separación e identificación (Torto *et al.*, 2013). Los métodos para recolección de volátiles bacterianos son variados en la literatura especializada; no existe un censo para utilizar un método u otro, pero de los más mencionados es la extracción por “sorbetes” con carbón activado,

grafitos de carbono, geles y polímeros (Korpi *et al.*, 2009). Existen reportes donde no es necesario utilizar el headspace para la recolección de volátiles, ya que se emplea el medio de cultivo para microorganismos como un tipo sorbete (Robacker y Bartelt, 1997). El medio de cultivo líquido pasa por un proceso de filtrado con membranas de nitrocelulosa donde se retienen los microorganismos y solo deja pasar el medio con los elementos volátiles producidos por estos seres (Robacker y Bartelt, 1997). Por otro lado, la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es la técnica más usada actualmente junto con la cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) para el análisis de los compuestos volátiles (Fiedler *et al.*, 2001; Augusto y Valente, 2002).

4. Ecología química de coléopteros Melolonthidae

Características morfológicas y hábitos

La familia Melolonthidae está integrada por las subfamilias Melolonthinae, Dynastinae, Rutelinae, Hopliinae, Sericinae y Euchirinae; a su vez, junto con las familias Scarabaeidae, Cetoniidae, Lucanidae, Passalidae, Trogidae, conforman la superfamilia Scarabaeoidea (Lamellicornia) (Cherman y Morón, 2014). Las características representativas de los integrantes de los Melolonthidae son la presencia de una maza antenal formada por tres a seis lamelas brillantes con sedas dispersas, el cuerpo ovalado y de colores diversos, además de que en los últimos tres segmentos abdominales presentan orificios respiratorios que están situados en el borde superior de los esternitos (Cherman y Morón, 2014). A estos insectos se les encuentra en la mayoría de los

hábitats, con excepción de los sitios que presentan hielo perenne y se localizan en el edafón hasta el dosel de cada lugar. Debido a las rutinas de estos insectos se les puede considerar como insectos, nocturnos crepusculares o diurnos. También se les considera como seres con importancia ecológica al tener la capacidad de ser degradadores, por intervenir en la polinización de plantas y algunos autores los toman en cuenta como zoogeográficos y bioindicadores. Los insectos en estado adulto consumen tejido vegetal, trozos de madera, hojarasca y algunas secreciones vegetales de frutos maduros o fermentados (Amat-García *et al.*, 2005). En estado larvario, la dieta es distinta al alimentarse de raíces, xilema, tubérculos, tejido vegetal y ciertos desechos vegetales. En algunos casos estos insectos pueden ser considerados como plagas por el hecho de obtener su energía con cultivos de importancia económica en nuestro país, por lo general se alimentan de arroz, frijol, sorgo, maíz, caña de azúcar, rosas, trigo, entre otros cultivos de importancia agrícola (Amat-García *et al.*, 2005; Morón *et al.*, 2012). Otras de las características destacables que se pueden mencionar de estos coleópteros es el desarrollo holometábolo presentes a lo largo de su vida. Por otro lado, las hembras ovipositan huevos con forma esferoide y elipsoide. En el huevo se fractura el corion para que la larva emerja a los 12 o 14 días después en larva de primer estadio. La siguiente etapa es denominada como larva de segundo estadio, en esta etapa la larva sufre un aumento significativo en la capa cefálica con respecto al estadio anterior. Consecutivamente se obtiene la larva del tercer estadio con una cabeza (más esclerosada) y mandíbulas de mayor tamaño. Después la larva sufre un estado de latencia (pupa) con un cambio general de sus estructuras. Al final, la pupa se rompe, emergiendo adulto en las épocas de lluvias que corresponden a los meses de mayo y junio (Ortega-Ojeda, 2005; Ramos-Santafe, 2013).

Esquemas de comunicación química

En las interacciones intra- e interespecíficas de los organismos, existen sustancias químicas que median estos procesos denominadas “infoquímicos”, los cuales inducen una respuesta fisiológica o de comportamiento con carácter adaptativo para cada uno de los interactuantes o de manera aditiva (Dicke y Sabelis, 1988). Los infoquímicos que median interacciones interespecíficas, también llamados aleloquímicos, se dividen dependiendo a que interactuante beneficie. Si el emisor es el que se beneficia se denominan kairomonas o bien, si es el receptor el beneficiado se clasifican como alomonas y cuando los dos interactuantes son beneficiados, sinomonas. Para el caso específico de los infoquímicos participantes en la mediación de interacciones intraespecíficas, se encuentran las feromonas. Las feromonas que median interacciones entre hembras y machos de la misma especie, con fines de apareamiento, se clasifican como feromonas sexuales (Nordlund y Lewis, 1976; Dicke y Sabelis, 1988). Los componentes anteriormente mencionados son necesarios para entender un esquema de Ecología química (área encargada del estudio de los infoquímicos) de cualquier ser vivo (Figura 1).

Con base en ello, el estudio de la Ecología química de los coleópteros Melolonthidae se ha intensificado en la década reciente, específicamente en los esquemas de comunicación química sexual de especies mexicanas (Romero-López, 2016). Para cualquier estudio con este enfoque es necesario un análisis detallado del comportamiento precopulatorio del modelo de estudio, enfocando la atención en el “llamado sexual”, patrón de comportamiento que consta de una serie de posturas, movimientos y actos realizados por la hembra para la liberación de las feromonas sexuales, los cuales atraen al macho y permitirán que se lleve a cabo la cópula (Romero-López *et*

al., 2010). La comunicación química sexual de estos coleópteros consta de un “emisor”; en este caso, la hembra con sitios productores de infoquímicos, como se reporta para los integrantes de *Anomala*, *Holotrichia* y *Phyllophaga* (Tada y Leal, 1997; Kim y Leal, 1999; Romero-López, 2016). Estos estudios confirman la presencia de epitelios especializados con células Clase I y Clase II, las cuales están relacionadas con la producción de feromonas sexuales en insectos y se encuentran localizados en determinados sitios en la hembra, como pueden ser los esternitos pigidiales, poros cuticulares, cámara genital y glándulas accesorias (Tada y Leal, 1997; Kim y Leal, 1999). El siguiente elemento del esquema de comunicación química sexual es el “mensaje” o feromonas sexuales, que en su mayoría están compuesta por una mezcla de ácidos grasos, aminoácidos, fenólicos e isoprenoides (Tillman *et al.*, 1999; Anaya *et al.*, 2001; Zarbin *et al.*, 2007). El ultimo elementos de este esquema es el “receptor”, en donde el macho posee lamelas antenales con quimiorreceptores particulares y están determinados para la captación de los mensajes químicos (Leal, 1998; Ochieng *et al.*, 2002; Romero López *et al.*, 2004; Romero López *et al.*, 2010).

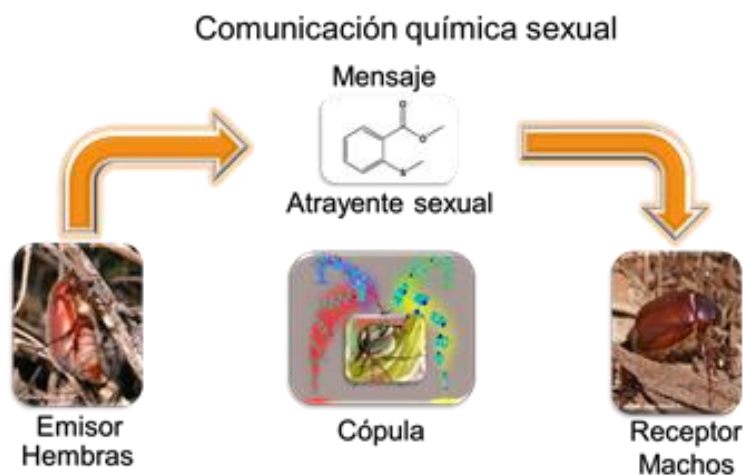


Figura 1. Esquema de comunicación química sexual de la familia Melolonthidae con tres elementos principales: emisor, mensaje y receptor.

Ensayos de confirmación de actividad biológica

Como se mencionó anteriormente, las hembras de Melolonthidae producen compuestos volátiles para la atracción del macho con el fin de llevar a cabo la cópula. De igual forma, todos los organismos producen compuestos orgánicos volátiles, los cuales pueden presentar una actividad biológica o no (Cardé y Willis 2008). Para determinar la actividad biológica de los compuestos emitidos por los insectos o de cualquier organismo, son necesarios los bioensayos. Se les consideran como bioensayos a las pruebas que se realizan con organismos vivos o parte de uno de sus sistemas sensoriales (Baker y Cardé, 1984). Este tipo de ensayos, en Ecología química, se utilizan para evaluar la actividad biológica de algún compuesto químico o para identificar las señales modificadoras del comportamiento (Finch, 1986). Existen diferentes tipos de bioensayos, de los cuales destacan los relacionados con las respuestas fisiológicas o comportamentales de los organismos; este tipo de pruebas se pueden llevar a cabo mediante olfatómetros o túneles de viento (Hare, 1998). Los olfatómetros son estructuras fabricadas con uno o varios brazos, con o sin flujo de viento, que generalmente se utilizan para determinar tasas de movimiento y las elecciones de dirección al caminar de los organismos (Hare, 1998). Referente a lo anterior, se utilizan generalmente dos tipos de olfatómetros; los considerados como de dos vías universalmente utilizados para evaluar la preferencia de dos compuestos simultáneos y el olfatómetro de cuatro

vías, donde es posible someter múltiples estímulos al mismo tiempo y permite registrar el tiempo en el que los organismos se mueven por cada sitio del dispositivo (López-Ávila y Rincón 2006).

En el caso de Melolonthidae, se registra el empleo de olfatómetros para llevar a cabo bioensayos que permitan determinar preferencias alimentarias (Nieves-Silva y Romero-López, 2016) o la respuesta hacia atrayentes sexuales (García-Canales y Romero-López, 2017; Martínez-Bonilla, 2019) de los adultos en olfatómetros pasivos de cuatro y dos vías. De los olfatómetros más empleados en bioensayos con productos volátiles de microorganismos son los de dos vías con un flujo de viento constante, comúnmente usados en las familias Drosophilidae, Hemiptera, Nitidulidae, Culicidae, entre otros (Nout y Bartelt, 1998; Ortiz y Molina, 2010; Becher *et al.*, 2012). Por otro lado, en el caso del género *Drosophila*, se han efectuado bioensayos con volátiles bacterianos en un olfatómetro de cuatro vías sin flujo de viento, obteniéndose respuestas positivas por parte de los insectos hacia estas sustancias (Robacker y Flath, 1995).

Estudio del comportamiento

Para tener una mejor comprensión del comportamiento de los organismos en bioensayos o en la naturaleza, los investigadores utilizan los denominados “etogramas” (Ruíz-Flores *et al.*, 2020). Tomando las palabras de Martín y Bateson (1986), el etograma es un catálogo de descripciones de patrones de comportamientos discretos, típicos de las especies-objeto que forman el repertorio comportamental básico de la especie. Con ello es posible describir los patrones específicos-sistemáticos de un proceder particular de los seres vivos. Para la construcción de un etograma, en general, se elabora un listado de los movimientos de expresión (pautas), se definen

las pautas relevantes del estudio y se delimitan categorías de observación con nombres específicos, tomando la unidad de análisis con el tipo de registro (frecuencias y porcentajes); asimismo, se diseña la tabla de registro-tipo y se plasma el esquema representativo de los datos obtenidos con las pautas, mediante círculos con líneas interconectadas (Lahitte *et al.*, 2003).

Los patrones de comportamiento que se han registrado para integrantes de Melolonthidae en su mayoría corresponden a estudios de interacción planta-insecto y de extractos de plantas con larvas, en olfatómetros o “arenas” (Romero-López y Arzuffi, 2010; Morales-Blancas y Romero-López, 2019; Ruíz-Flores *et al.*, 2020). No obstante, a la fecha los etogramas relacionados con interacciones microorganismos-adultos Melolonthidae brillan por su ausencia, por lo cual hay vacíos de información en torno a las respuestas de estos hacia este tipo de volátiles.

5. Comunicación química de integrantes del género *Macrodactylus*

Generalidades morfológicas y hábitos

Los miembros de este taxón son conocidos como “frailecillos”, “taches” o “escarabajos de las rosas”. Se trata de insectos que se encuentran activos en verano y su cópula la efectúan durante las horas soleadas sobre las hojas de las plantas; una vez culminado el apareamiento, la mayoría de los machos muere y las hembras proceden a ovipositar (de quince a treinta huevos). Después de 15 o 30 días, los huevos eclosionan y dan lugar a los diferentes estadios larvales. Gran parte de las especies descritas de este género, en estadio larval, están asociadas a cultivos como: frijol, trigo,

nabo, maíz, alfalfa, centeno y maíz. En el estadio adulto, su alimentación se basa en hojas, polen, frutos y flores de los pinos, aguacates, maizales, ciruelos, manzanos, capulines, tejocotes, sauces, truenos, entre otros. Se cuenta con reportes donde los adultos, al emerger después de las primeras lluvias, se alimentan de las hojas de los cultivos de maíz, por lo que a los individuos de este género se les ha considerado como plaga por algunos autores (Arce-Pérez y Morón, 2000; Hernández y Benz, 2004).

Anatomía del aparato reproductor de hembras de *Macrodactylus* relacionadas con su comunicación química

Las hembras de este género conservan el mismo patrón anatómico de las estructuras en su aparato reproductor con respecto a los demás integrantes de Melolonthidae, al poseer una espermateca, dos pares de glándulas accesorias unidas en la estructura denominada como cámara genital (estructuras productoras de feromonas) donde en la región dorsal se encuentra conectada la *bursa copulatrix* y en la región apical de la cámara genital esta presenta el oviducto común (Figura 2). Este elemento en la parte media se bifurca en los oviductos laterales y cada una de estas bifurcaciones presenta una ovariola. En la cámara genital existen elementos conectados por membranas plegadas con forma ovalada más grande en la región basal que en la apical y en su ápice de forma asimétrica presenta gran cantidad de fibras y poros; estas estructuras se denominan placas anales. Cada estructura es distinta en forma y tamaño para cada especie (Benítez-Herrera *et al.*, 2015; Trujillo-Vélez, 2017).

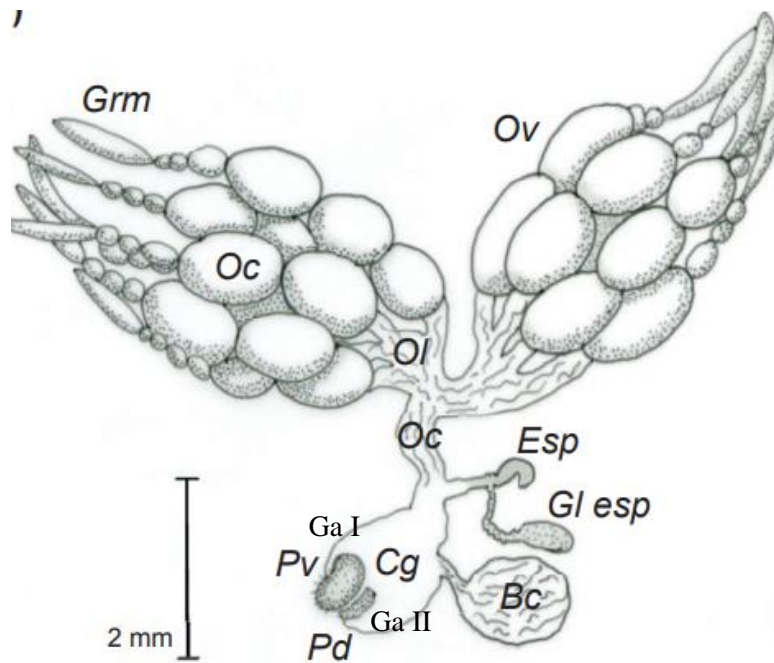


Figura 2. Esquema general del aparato reproductor de hembras de Melolonthidae. Bc= *Bursa copulatrix*; Cg= Cámara genital; Esp= Espermateca; Ga I= Glándula accesoria tipo I; Ga II= Glándula accesoria tipo II; Gl esp= Glándula de la espermateca; Grm= Germario; Oc= Oocito; Ov= Ovario; Oc= Oviducto común; Ol= Oviducto lateral; Pd= Placa genital dorsal; Pv= Placa genital ventral (Tomado de Benítez-Herrera *et al.*, 2015 para *Macroductylus mexicanus*).

En los últimos años se tiene información sobre comunicación química de los integrantes de este género referente al emisor, consistente en sitios productores localizados en la cámara genital y en las glándulas accesorias tipo I y II de las hembras, las cuales presentan principalmente células Clase I, especializadas en la producción de feromonas (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Además, se cuenta con evidencias de que los extractos de la cámara genital y de las glándulas accesorias de *M. mexicanus* provocan respuestas de atracción estadísticamente significativas de los machos con respecto a las hembras (García-Canales y Romero-López, 2017; Martínez-Bonilla, 2019). En lo

referente al mensaje químico, se ha obtenido un perfil de la feromona sexual de esta especie, conformado por ácidos grasos, ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos y metil ésteres (García-Canales y Romero-López, 2017; Romero-López *et al.*, datos no publicados). Con relación al receptor, se establece que los cuerpos fungiformes y los lóbulos olfativos asociados con las sensilas placoides de las lamelas antenales de los machos de *M. mexicanus* y *Macroductylus nigripes* Bates, están posiblemente vinculados con el sistema olfativo y la quimiorrecepción de las feromonas (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015; Romero López *et al.*, 2017).

6. *Macroductylus mexicanus* Burmeister como modelo de estudio

Los integrantes de esta especie se localizan en Tlaxcala, Puebla, Ciudad de México, Estado de México, Michoacán, Querétaro, Veracruz, Oaxaca, Coahuila, Morelos, Hidalgo, Durango y Jalisco y su periodo de actividad es entre mayo a septiembre y se encuentran en climas semi-cálidos y templados, en altitudes entre los 100 y los 2650 m (Arce-Pérez y Morón, 2000). Por lo general, se encuentran asociados a *Sphaeralcea angustifolia* (Cavanilles, Malvaceae), *Simsia amplexicaulis* (Cavanilles, Asteraceae), *Pyrus communis* (L., Rosaceae), *Pinus sp* (L., Pinaceae), *Zea mays* (L., Poaceae), *Erythrina americana* (Mill, Fabaceae) y *Baccharis conferta* (Kunth, Asteraceae) (Arce-Pérez y Morón, 2000). Los adultos presentan una longitud corporal de 9-12.5 mm y de ancho 3-3.5 mm, de color verde-grisáceo, verde amarillento con extremidades de color rojizo y con el cuerpo cubierto por sedas gruesas (Figura 3). En los machos, la cápsula genital tiene una longitud de 3.5 mm con falobase no articulada de color rojiza, cabeza negra de textura rugosa cubierta de

vestidura exceptuado, pronoto negro de vestidura setífera con ápices lanceoladas, cuerpo de forma oblicua, placa anal de forma ovalada de color obscura y translúcida en la región apical. En el caso de la hembra, esta presenta el cuerpo más corto con respecto al de los machos; el abdomen es globoso, pronoto ancho, la placa pigidial es corta de forma triangular y con largas placas genitales (Arce-Pérez y Morón, 2000).



Figura 3. Hembra de *Macrodactylus mexicanus* alimentándose de una hoja de maíz, mostrando sus principales caracteres morfológicos corporales externos como la coloración verde-grisáceo o verde amarillento con extremidades de color rojizo y con el cuerpo cubierto por sedas gruesas.

Se sabe que en condiciones naturales y de laboratorio, las hembras de esta especie liberan un atrayente que provoca el acercamiento de los machos, sin observarse un “llamado sexual” como el mostrado por otras especies del grupo (Romero-López, 2016). Los sitios productores de feromonas sexuales podrían localizarse en la cámara genital y en las glándulas accesorias tipos I y II de las hembras (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Estas estructuras presentan epitelios glandulares pluriestratificados, a excepción de la cámara genital que presenta monoestratificado, con células

relacionadas con la producción de feromonas en insectos (Percy-Cunningham y Macdonald, 1987). De manera conjunta, se ha comprobado por ensayos en olfatómetro que extractos de la cámara genital y de las glándulas accesorias provocan respuestas estadísticamente significativas de los machos (García-Canales y Romero-López, 2017). Es probable que el mensaje químico involucrado en dichas respuestas esté conformada por compuestos como el ácido n-hexanoico, ácido octadecanoico, ácido oleico y ácido n-hexanoico (García-Canales y Romero-López, 2017). Para el receptor se menciona la presencia de sensilas aurículas, basicónicas, celocónicas, placoideas relacionadas con la captación y percepción de este mensaje químico y se sugiere que los placoideos, por número y distribución en la cara interna de las lamelas, se asocian con atrayentes sexuales (Romero López *et al.*, 2017).

7. Microorganismos asociados con el aparato reproductor de hembras de Melolonthidae y posibles implicaciones químico-ecológicas

En el caso de los coleópteros Melolonthidae distribuidos en México, existen bacterias en el interior de la cámara genital de *M. nigripes*, *Phyllophaga obsoleta* Blanchard, *Phyllophaga ravidata* Blanchard y *Cyclocephala lunulata* Burmeister, las cuales pertenecen a los géneros *Klebsiella* y *Proteus* (Romero-López, 2016; Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017; Pérez-Estrada, *et al.*, 2020). Esto ya había sido registrado por Hoyt *et al.* (1971) para hembras de *C. zealandica*, siendo el primer estudio en el cual se evidenció la existencia de microorganismos productores de feromonas sexuales, aunque en este caso, en el interior de las glándulas accesorias. A pesar de lo

anterior, no se tiene muy bien definido cuál es la relación que presentan estos microorganismos con los coleópteros y no se cuenta con reportes sobre los efectos de los productos bacterianos en estos insectos, sobre todo si estos son sus hospederos.

Justificación

Las interacciones que se observan en la naturaleza y en el caso particular de las interacciones coleópteros-microorganismos, la información se centra en aspectos de diversidad morfológica y funcional dentro del tubo digestivo de estos insectos. Para los coleópteros Melolonthidae, la información es aún escasa en este sentido, sobre todo en lo referente a interacciones entre los microorganismos alojados en el interior de cámara genital y glándulas accesorias con sus hospederos. El registro tradicional y único hasta hace unos 5 años era el de Hoyt *et al.* (1971) con relación a la participación de microorganismos en la producción de la feromona sexual de *C. zealandica* y afortunadamente se ha venido complementando este esquema con estudios recientes de especies de Melolonthidae distribuidas en México.

Esto forma parte del interés del presente estudio, con el aislamiento y descripción morfológica de los microorganismos que pudieran encontrarse en el interior de la cámara genital y glándulas accesorias de *M. mexicanus*, además de confirmar la actividad biológica de los extractos de dichos microorganismos. Se trata del primer esfuerzo por establecer la asociación entre microorganismos y adultos de *Macroductylus*. Adicionalmente, la información generada complementará el esquema

de comunicación química del género y de *M. mexicanus* y a mediano plazo podría sentar las bases para el establecimiento de estrategias de manejo basadas en volátiles bacterianos específicos.

Hipótesis

Los machos de *M. mexicanus* muestran respuestas positivas a los volátiles liberados por extractos de las bacterias encontradas en el interior de la cámara genital de las hembras de esta especie.

Objetivo general

Evaluar la respuesta de machos de *M. mexicanus* hacia extractos de bacterias que se localizan en el interior de la cámara genital y de las glándulas accesorias de hembras de esta especie.

Objetivos particulares

- Examinar el interior de la cámara genital y las glándulas accesorias de hembras de *M. mexicanus* en la búsqueda de microorganismos.

- Describir la morfología de las colonias bacterianas y de las bacterias individuales aisladas del interior de estas estructuras.
- Establecer la metodología de extracción de volátiles bacterianos con los cuales se efectúan los bioensayos de confirmación de actividad biológica.
- Registrar las respuestas positivas de los machos de *M. mexicanus* al exponerlos a los extractos bacterianos en los bioensayos de laboratorio con olfatómetro.
- Elaborar un etograma de los patrones mostrados por la atracción de los machos de *M. mexicanus* hacia los extractos bacterianos.

Material y métodos

Captura de adultos de *M. mexicanus*

Los adultos de esta especie se recolectaron manualmente en diferentes especies vegetales que se encuentran en el Jardín Botánico Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (coordenadas 19°00'13.2" N - 98°12'11.6" W). Los especímenes obtenidos se sexaron y determinaron taxonómicamente con base en las claves dicotómicas de Arce-Pérez y Morón (2000). Para los experimentos, se seleccionaron las hembras que presentaran una apariencia corporal externa sin deformaciones ni lesiones y sin huevos en su región abdominal.

Nota ética

Los organismos se manipularon y mantuvieron bajo las normativas de la Declaración Universal de los Derechos de los Animales y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Para no generar estrés en los insectos, se mantuvieron en un microambiente en condiciones similares a su entorno natural con una temperatura de 24 ± 2 °C, humedad relativa de 60 ± 5 % e iluminación de 60 w. Para el sacrificio de las hembras, con el objetivo de extraer y aislar a los microorganismos, se tomó en cuenta que fuera de forma rápida (por decapitación), evitando el sufrimiento prolongado del insecto. En el caso de este tipo de animales y por las áreas de estudio (Ecología química y Microbiología), es la única forma de provocar la muerte, ya que no debe aplicar ningún tipo de componente químico debido a posible contaminación de las muestras y por ende, alteración en el experimento (Jayo y Cisneros, 2008). Para el manejo de los cadáveres, se consideraron como desechos biológicos infecciosos, por lo que se manipularon bajo los lineamientos de la normativa NOM-087-ECOL-SSA1-2002, para su posterior incineración en el bioterio Claude Bernard, BUAP.

Estudio microbiológico

Las hembras seleccionadas de *M. mexicanus* se sometieron a un proceso de lavado con agua destilada y etanol al 70% y se colocaron en una solución Ringer, donde se diseccionaron para extraer el aparato reproductor de cada hembra. De los aparatos reproductores obtenidos, se separó la cámara genital y las glándulas accesorias tipo I y II, las cuales se lavaron con etanol al 70% y

posteriormente se colocaron en solución Ringer. A cada una de las cámaras genitales se les efectuó un corte sagital y de las mitades obtenidas se obtuvieron raspados del interior, los cuales a su vez se depositaron en placas con agar Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Con las glándulas accesorias se llevó a cabo el mismo procedimiento que con las cámaras genitales. Posteriormente, se colocó una muestra del interior de las estructuras en placas de agar LB, incubándolas a 37°C por 24 h.

Bioensayos de confirmación de actividad biológica

Diseño experimental

Al igual que la recolecta y selección de adultos de *M. mexicanus* para el estudio microbiológico, los individuos empleados para los bioensayos se seleccionaron de forma dirigida (machos con apariencia corporal externa sana). Los bioensayos consistieron en someter a pruebas de atracción a treinta machos adultos de esta especie y como unidad experimental se consideró cada extracto bacteriano. En un olfatómetro especializado, diseñado para tales fines, se evaluó la frecuencia con que cada macho de estos coleópteros respondía positivamente hacia los estímulos. Como tratamientos se utilizaron los extractos bacterianos de dos especies de coleópteros (*M. mexicanus* y *Phyllophaga ravidata* Blanchard) con sus respectivos controles (medio Luria Bertani sin crecimiento bacteriano). Se contemplaron quince repeticiones para la primera combinación de estímulos y seis repeticiones para la segunda combinación de estímulos.

Pruebas en olfatómetro

Para los bioensayos se utilizó un olfatómetro de vidrio semicilíndrico de cuatro vías modificado de Romero-López y Arzuffi (2010), el cual está conformado por cuatro oquedades provistas de un receptáculo semicilíndrico cada una (Figura 4). En cada oquedad se colocó de forma aleatoria cada uno de los estímulos químicos considerados. De la colonia bacteriana de cada especie de coleóptero, se inocularon 10 µl en 100 ml de medio LB líquido en constante agitación por 24 h a 37°C. Los cultivos obtenidos se filtraron con membranas de 0.4 µm (*M. mexicanus*) y 0.8 µm (*P. ravidia*), con el propósito de obtener un extracto bacteriano. En los experimentos se consideraron tres tratamientos: a) 0.1 ml de extracto de bacterias de *M. mexicanus* en 1 cm² de papel filtro; b) 0.1 ml de extracto de bacterias de cámara genital de *M. nigripes*, en 1 cm² de papel filtro y c) 0.1 ml de extracto de bacterias de cámara genital de *P. ravidia*, en 1 cm² de papel filtro. Como control se empleó 1 cm² de papel filtro impregnado con 0.1 ml de medio LB estéril. Las bacterias de *P. ravidia* y *M. nigripes* se consideraron en el experimento con el objetivo de determinar si la atracción de los machos de *M. mexicanus* es específica.

Por lo anterior, en el olfatómetro se llevaron a cabo dos tipos de bioensayos; en el bioensayo I se comparó la respuesta de machos hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus*, contrastándola con la respuesta hacia control, mientras que en el bioensayo II se registró la respuesta de machos hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus* en comparación con la respuesta de estos hacia el control, así como hacia los extractos bacterianos de *P. ravidia* y de *M. nigripes*. Las oquedades vacías se consideraron en ambos bioensayos para descartar un efecto en la respuesta de los organismos por el manejo del olfatómetro (lavado, manipulación y ambiente).

Se consideró como respuesta positiva el momento en que cada adulto de *M. mexicanus*, colocado en el centro del dispositivo, se desplazara a través de la base del olfatómetro hacia la oquedad del mismo que contuviera el estímulo químico y permaneciera en esta zona (ya fuese con alguna pata o el cuerpo completo) por lo menos 2 s. Para cada uno de los bioensayos se emplearon quince machos (n= 15) en un periodo de 5 min por prueba. Una vez concluido el experimento, los insectos se colocaron en sus recipientes originales, descartándolos para próximos eventos de este tipo. Todas las pruebas se llevaron a cabo en condiciones constantes de temperatura (24 ± 2 °C), humedad relativa (60 ± 5 %) e iluminación (60 watts), entre las 11:00 y las 14:00 hrs, considerado como el periodo de actividad sexual de los adultos de *M. mexicanus* (Romero-López, 2016).

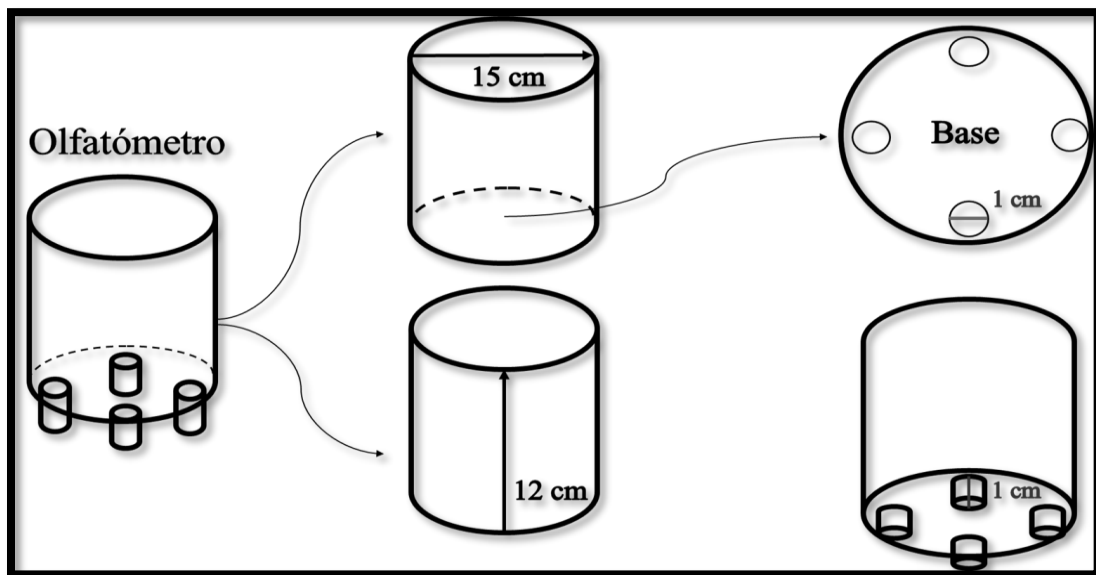


Figura 4. Olfatómetro de vidrio de cuatro vías diseñado y utilizado para los bioensayos con volátiles bacterianos y adultos de *Macrodactylus mexicanus*.

Análisis de datos

Para demostrar la asociación de los datos (frecuencias de respuestas positivas de machos de *M. mexicanus* a los diferentes tratamientos), se empleó una prueba de Ji-cuadrada con el software R v3.6.2.

Registro del comportamiento insecto-extracto bacteriano

Los bioensayos anteriormente descritos se grabaron con una cámara de 12MP, f/1.5-2.4, 1.4µm, dual píxel PDAF (Galaxy note 9) y se registró el comportamiento de los machos *M. mexicanus* desde que se colocó el insecto dentro del olfatómetro hasta la culminación de los 5 min por prueba. Con lo anterior, se construyó una etograma tomando como base los trabajos de Romero-López y Arzuffi (2010) y Morales-Blancas y Romero-López (2019).

Resultados

Estudio microbiológico

En la zona de la placa correspondiente a la cámara genital de las hembras diseccionadas, se presentó crecimiento de una colonia bacteriana (Figura 5), la cual mostró un tamaño de 1-2 mm, color rosa-crema, forma circular con elevación convexa y un margen entero. En el sitio de las glándulas accesorias, no se observó crecimiento de algún microorganismo.

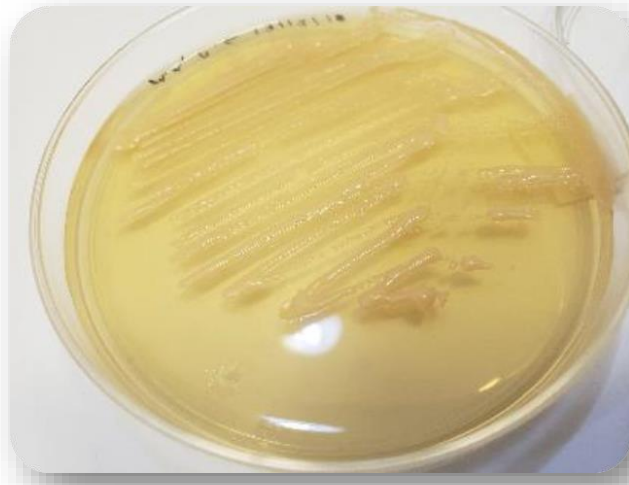


Figura 5. Sembrado de bacterias obtenidas en la cámara genital de *Macroductylus mexicanus* en medio LB sólido. Se observa una colonia bacteriana color crema-rosa de una consistencia cremosa con bordes lisos, opaca y refleja parte de la luz.

Bioensayos

Se observaron respuestas positivas estadísticamente significativas por parte de los machos hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus* (Figura 6), con respecto a las respuestas hacia el control y las oquedades vacías (Figura 7, $\chi^2 = 17.04$, $p < 0.001$). Con respecto a las pruebas efectuadas en conjunto con los extractos bacterianos de *P. ravidia*, no se obtuvo una respuesta positiva significativa, pero se observa una tendencia de taxis hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus* (Figura 8, $\chi^2 = 2.6$, $p = 0.4459$).

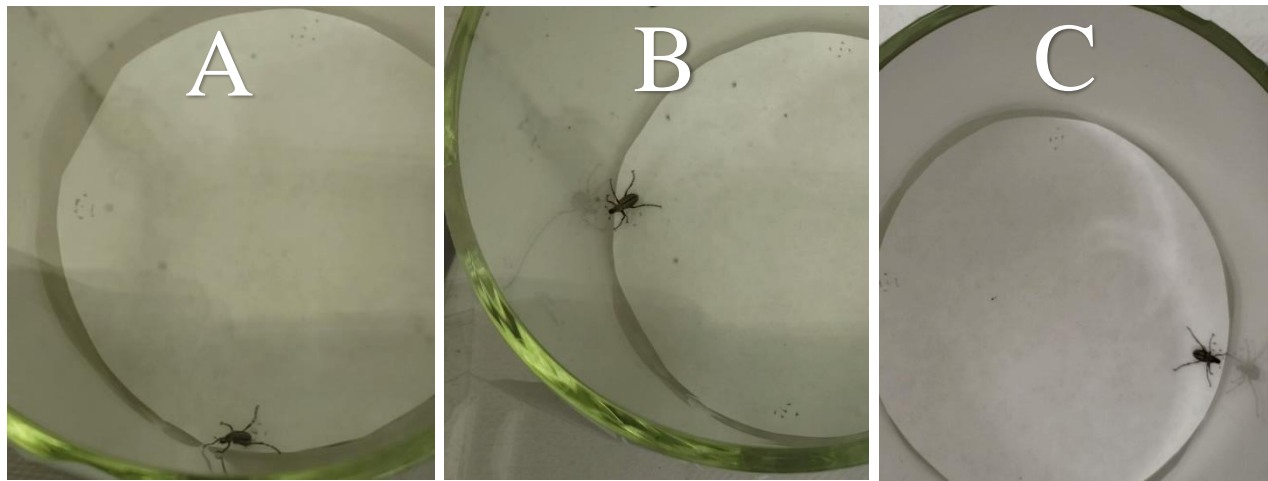


Figura 6. Macho de *Macroductylus mexicanus* posado sobre una de las oquedades del olfatómetro en la cual se colocó uno de los extractos bacterianos. Esta fue considerada como respuesta positiva por parte del insecto hacia los volátiles liberados por los extractos, con relación al control. A) Respuesta positiva del macho de *M. mexicanus* al extracto de las bacterias colocadas en la oquedad del sur. B) Respuesta positiva del macho de *M. mexicanus* al extracto bacteriano presente en la oquedad del oeste. C) Respuesta positiva del macho de *M. mexicanus* al extracto bacteriano colocado en la dirección este del olfatómetro.

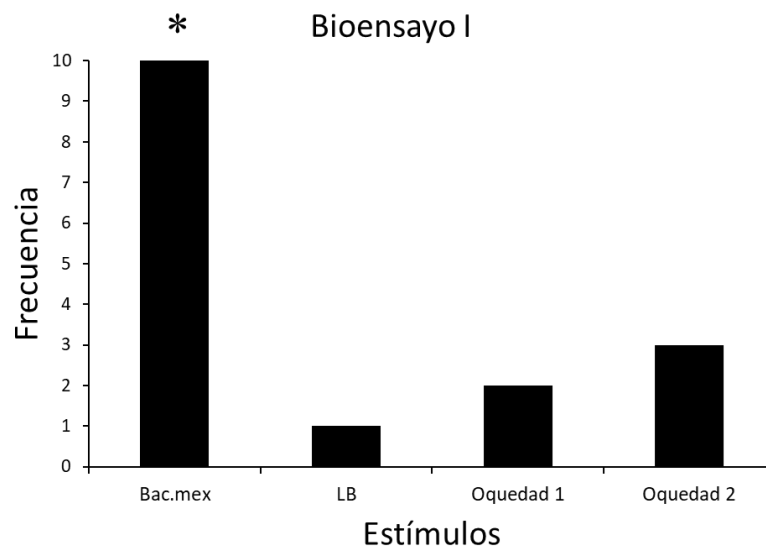


Figura 7. Bioensayos en olfatómetro donde se evidencian las respuestas positivas de machos de *Macroductylus mexicanus* hacia los extractos bacterianos, medio Luria Bertani líquido y oquedades vacías. χ^2 (1, n= 15) = 17.04, $p < 0.001$. Bac.mex= 10, LB= 1

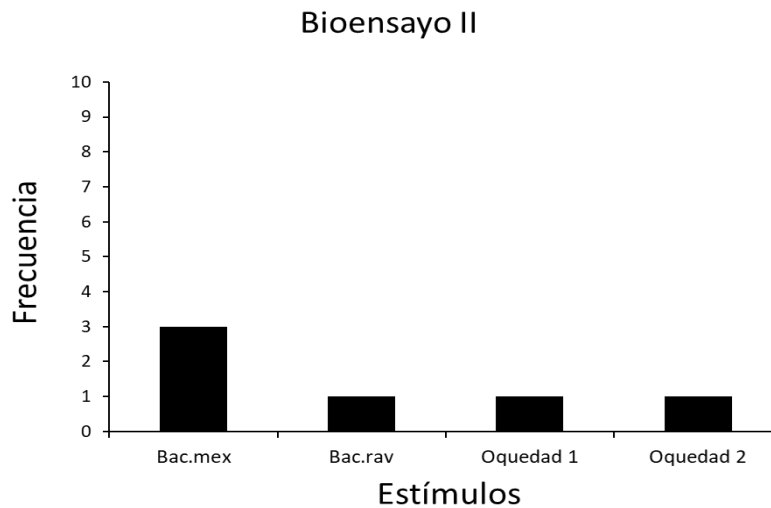


Figura 8. Bioensayos en olfatómetro donde se evidencia las respuestas positivas de machos de *M. mexicanus* hacia sus propios extractos bacterianos, extractos bacterianos de *Phyllophaga ravida* y oquedades sin elementos. $\chi^2 (1, n= 6) = 2.6, p= 0.4459$. Bac.mex= 3, Bac.rav=1.

Registro del comportamiento de machos de *M. mexicanus* hacia los extractos bacterianos

Los machos de *M. mexicanus* presentaron nueve patrones de comportamiento como parte de la respuesta hacia los volátiles liberados por los extractos bacterianos de la misma especie. Los patrones que se observaron con mayor frecuencia fueron: desplazamiento terrestre aleatorio (DTA), intento de desplazamiento por paredes (IDP), movimiento de cabeza (MC), movimiento giratorio (MG) y desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias (DADB). Con referencia a las transiciones, las más frecuentes fueron: Intento de desplazamiento por paredes - Desplazamiento terrestre aleatorio (IDP-DTA), Desplazamiento terrestre aleatorio - Intento de desplazamiento por paredes (DTA-IDP), Movimiento giratorio - Movimiento de antenas (MG-MA), Movimiento de antenas -

Movimiento de cabeza (MA-MC), Movimiento de cabeza - Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias (MC-DADB), y Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias - Permanencia por encima de la oquedad (DADB-PEO). En los Cuadros 1 y 2 se describen todos los patrones y transiciones de comportamiento con detalle, mientras que en la Figura 9 se muestra el etograma correspondiente.

Cuadro 1. Repertorio de patrones de comportamiento registrados en los machos de *Macroductylus mexicanus* en los bioensayos con extractos bacterianos de *Macroductylus mexicanus*.

	DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DE COMPORTAMIENTO
DTA	Desplazamiento terrestre aleatorio
DAA	Desplazamiento aéreo aleatorio
IDP	Intento de desplazamiento por paredes
MG	Movimiento giratorio
DADB	Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias
PEO	Permanencia por encima de la oquedad
MC	Movimiento de cabeza
INM	Inmóvil
MA	Movimiento de antenas

Cuadro 2. Repertorio de transiciones observadas del comportamiento registrados por parte de los machos de *Macroductylus mexicanus* en los bioensayos con extractos bacterianos de *M. mexicanus*.

	DESCRIPCIÓN DE LAS TRANSICIONES
IDP-DTA	Intento de desplazamiento por paredes - Desplazamiento terrestre aleatorio
DTA-IDP	Desplazamiento terrestre aleatorio - Intento de desplazamiento por paredes
MG-MA	Movimiento giratorio - Movimiento de antenas
MA-MC	Movimiento de antenas - Movimiento de cabeza
MC-DADB	Movimiento de cabeza - Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias
DADB-PEO	Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias - Permanencia por encima de la oquedad
INM-MG	Inmóvil - Movimiento giratorio
DDA-MG	Desplazamiento aéreo aleatorio - Movimiento giratorio
PEO-IDP	Permanencia por encima de la oquedad - Intento de desplazamiento por paredes
IDP-DAA	Intento de desplazamiento por paredes - Desplazamiento aéreo aleatorio
DAA-DTA	Desplazamiento aéreo aleatorio - Desplazamiento terrestre aleatorio
DTA-DAA	Desplazamiento terrestre aleatorio - Desplazamiento aéreo aleatorio
INM-DTA	Inmóvil - Desplazamiento terrestre aleatorio
DTA-INM	Desplazamiento terrestre aleatorio - Inmóvil
PEO-DTA	Permanencia por encima de la oquedad - Desplazamiento terrestre aleatorio
DTA-PEO	Desplazamiento terrestre aleatorio - Permanencia por encima de la oquedad
DADB-DTA	Desplazamiento aéreo dirigido a las bacterias - Desplazamiento terrestre aleatorio

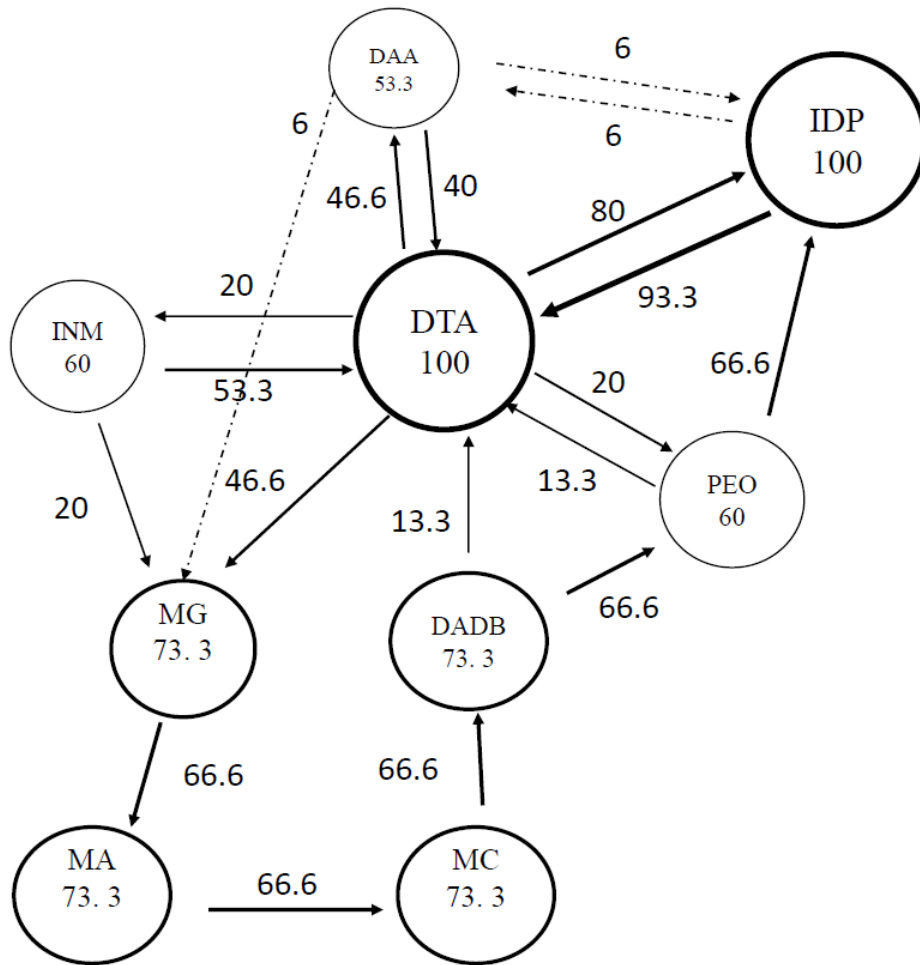


Figura 9. Etograma de machos de *Macrodactylus mexicanus* en el cual se representan las respuestas de estos hacia los volátiles bacterianos. Los círculos indican los patrones de comportamiento y las flechas indican las transiciones. El tamaño de los círculos hace referencia a la frecuencia con que se presentó cada patrón, mientras que el grosor de las líneas muestra la frecuencia con que se presentó cada transición. Los números dentro de los círculos o sobre las flechas expresan los porcentajes del total de ínvodos que presentaron ese comportamiento. n= 15.

Discusión

Estudio microbiológico

Hoyt *et al.* (1971) manifestaron la presencia de microorganismos en el interior de las glándulas accesorias de *C. zealandica*, pero en este trabajo se aislaron bacterias de la cámara genital de *M. mexicanus* sin crecimiento de bacterias en las glándulas accesorias, de la misma manera que se reportó para *P. obsoleta* Blanchard (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017). Las colonias bacterias extraídas de la cámara genital de *M. mexicanus* son de color crema-rosado, tamaño de 1-2 mm, forma puntiforme, borde ondulado, elevación convexa, superficie lisa, opaca y con una luz reflejante brillante. Lo anterior difiere con lo reportado por Hoyt *et al.*, (1971), Rosete-Enríquez y Romero-López (2017) y Pérez-Estrada *et al.*, (2020) al encontrar colonias bacterianas totalmente distintas en el color, forma y tamaño. La escasez de los artículos relacionados con microorganismos alojados en el aparato reproductor de coleópteros, impide saber con exactitud cómo se encuentran distribuidas las bacterias en el interior de los coleópteros, también complica el conocer en que medios de cultivos se pueden cultivar estos microorganismos y si existen microorganismos en el aparato reproductor en todas las especies de escarabajos en la familia (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016; Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017; Pérez-Estrada *et al.*, 2020). Por lo anterior, dificulta tener un claro panorama del porque la diferencia en los distintos trabajos. Una de las posibles explicaciones se deba al modelo biológico utilizado en cada uno de los estudios. Cada especie tiene una alimentación, ciclos de vida, hábitat, comportamiento y anatomía del aparato reproductor propios de cada uno y por esto, cada especie de escarabajo probablemente obtenga las bacterias de maneras distintas y se alojen en diferentes partes del aparato reproductor (Perlmutter

y Bordenstein, 2020). Se ha observado que los sitios donde se encuentren los organismos, el tipo de alimentación, el tipo de hospedero al que estén ligados, el ciclo de vida y las diferentes interacciones que realizan, intervienen en tipo de microorganismos que puede tener un ser vivo en el interior (Dillon and Dillon, 2004; Chen *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2019; Perlmutter y Bordenstein, 2020). Un claro ejemplo de lo anterior es con *Spodoptera littoralis* (Boisduval), esta es una especie plaga en su etapa larvaria, en las primeras etapas del desarrollo larval tiene *Enterococcus*, *Pantoea* y *Citrobacter* en su interior, mientras avanza el desarrollo de la larva también se modifica los microorganismos del interior hasta tener solo en la etapa adulta a *Klebsiella* (Chen *et al.*, 2016). Para comprobar las ideas anteriores, es necesarios realizar estudios de identificación bacteriana en otras especies de la familia Melolonthidae, utilizar otros medios de cultivo enriquecidos en la metodología de extracción de bacterias y llevar a cabo secuenciaciones masivas en la cámara genital y glándulas accesorias de los coleópteros para determinar bacterias no cultivables.

Los microorganismos encontrados en el interior de los insectos es su mayoría se encuentran alojados en el intestino y se pueden encontrar una gran variedad de organismos que van desde bacterias hasta hongos (Leroy *et al.*, 2011). Las bacterias en el intestino de los insectos presentan características variadas, pero en general son Gram negativas-positivas, aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013). En cambio, los microorganismos detectados en la cámara genital de los insectos son solamente bacterias Gram negativas y aerobias facultativas (Marshall *et al.*, 2016; Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017; Pérez-Estrada *et al.*, 2020). Por lo anterior, se sugiere que las bacterias encontradas en el aparato reproductor de *M. mexicanus* sean Gram negativas y aerobias facultativas.

Con respecto a las diferencias de las bacterias encontradas en cada trabajo pueden deberse a que los organismos (animales) al tener metabolismos limitados necesitan de otros organismos para poder llevar a cabo la unión y degradación de compuestos químicos (Rivera-Orduña *et al.*, 2009). Tomando en cuenta lo anterior, probablemente puede pasar algo similar con las bacterias alojadas en el aparato reproductor de los escarabajos, por una parte, los epitelios de las zonas productoras de volátiles aportan los elementos base de las feromonas; y en cambio, los microorganismos, al producir una vasta diversidad de metabolitos, crean la variación de las feromonas sexuales de esta familia, al adicionar los grupos funcionales. Pero para que lo anterior se confirme, es necesario identificar las bacterias que se encuentran en otros Melolonthidae y determinar qué compuestos están liberando.

Olfatómetro

El olfatómetro diseñado en este trabajo permitió que los insectos mostraran respuestas positivas hacia los estímulos probados, con una eficiencia similar a los olfatómetros reportados en otras especies de la misma familia (Romero-López y Arzuffi, 2010; Nieves-Silva y Romero-López, 2016; García-Canales y Romero-López, 2017; Martínez-Bonilla, 2019). El olfatómetro empleado en el presente estudio puede ser utilizado para evaluar respuestas de los volátiles bacterianos de una forma segura al no tener contacto con ellas y sobre todo otorga una simpleza para remover e ingresar las muestras de las bacterias. Por otro parte, el diseño del dispositivo permite utilizar diferentes métodos para desinfectar sin que la estructura del olfatómetro sea dañada en algún sentido, al contrario de los olfatómetros hechos con acrílico en trabajos previos (Nieves-Silva y Romero-López, 2016; García-Canales y Romero-López, 2017). Además, es el primer olfatómetro

diseñado para evaluar, de forma pasiva, los extractos de volátiles microbianos obtenidos a través de membranas de filtración para los integrantes de la familia Melolonthidae.

La forma del olfatómetro y el diseño permiten ventajas con respecto a otros tipos de olfatómetro utilizados para bioensayos en insectos como la facilidad para ingresar-eliminar los diferentes estímulos a probar, elimina parte del disturbio de las decisiones de los organismos, permite un desplazamiento por el área para una adecuada respuesta de los insectos, permite observar comportamientos terrestres y aéreos de los insectos, evita el ingreso de otros compuestos volátiles, requiere de un menor número de pasos y equipo adicional para su funcionamiento y presenta la misma eficiencia de respuesta de los insectos con respecto a los olfatómetros propuestos para la familia (Vet *et al.*, 1983; Nieves-Silva y Romero-López, 2016; García-Canales y Romero-López, 2017). Por lo general, la mayoría de olfatómetro en forma de “Y” presentan problemas al ingreso de las muestras al artefacto, además en la parte de la intersección de los brazos existe una perturbación en las decisiones de los organismos para la toma de dirección, por lo que pueden caer por casualidad en los brazos sin responder a los estímulos (Vet *et al.*, 1983).

Bioensayos

Existe un reporte relacionado con respuestas de los coleópteros hacia las bacterias extraídas en las glándulas accesorias del aparato reproductor femenino (Marshall *et al.*, 2016). En el anterior trabajo muestran una llegada de machos de *C. zealandica* a las trampas diseñadas con bacterias en un medio enriquecido. Para el caso del presente trabajo el resultado fue análogo, obteniéndose una mayor frecuencia de respuestas positivas por parte de los machos de *M. mexicanus* hacia los

extractos bacterianos de las hembras de la misma especie. En contraste a lo reportado para *C. zealandica*, con *M. mexicanus* se controlaron las condiciones ambientales para obtener una respuesta adecuada de los estímulos probados en el olfatómetro y se obtuvo el primer trabajo en dar una quimiotaxia de los miembros de la familia Melolonthidae con volátiles microbianos.

Con respecto a la respuesta de los machos *M. mexicanus* es muy similar a lo reportado por García-Canales y Romero-López (2017) con una quimiotaxia de los machos de *M. mexicanus* hacia las estructuras aisladas de la cámara genital y las glándulas accesorias que presentan epitelios glandulares productores de atrayentes sexuales (Benítez-Herrera y Romero-López 2015, con una respuesta positiva casi del 80 %). Por otro lado, también coincide con frecuencia de taxias que presentó el macho de la misma especie con respecto a hembras vivas (Benítez-Herrera y Romero-López, 2015). Por lo tanto, las bacterias defectivamente están relacionadas con la producción de atrayentes sexual, lo que se desconoce es de qué manera lo están haciendo; para esto es necesario el realizar estudios de identificación de compuestos volátiles tanto en las estructuras reproductoras como a las bacterias alojadas en estas zonas. Las bacterias obtenidas del interior de la cámara genital de estos coleópteros posiblemente estén estrechamente involucradas en la producción de los atrayentes sexuales, debido a que los microorganismos producen múltiples volátiles derivados de su metabolismo (Korpi *et al.*, 2009). En cambio, para las bacterias de *M. mexicanus* unas de sus vías de síntesis de volátiles pueden ser la de vía Embden-Meyerhof y la Entner-Doudoroff (glucólisis primaria); estas vías son las principales productoras de alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos (Todar, 2012), los cuales podrían ser precursores de compuestos atrayentes en *M.*

mexicanus, como es el caso de los ácidos n-hexanoico y octadecanoico (García-Canales y Romero-López, 2017).

Los bioensayos que se usan para los estudios de atracción de atrayentes sexuales, en su mayoría, son de los considerados como activos debido a que son los que presentan resultados consistentes y están diseñados para usarse en insectos “voladores” (López-Ávila y Rincón, 2006). Pero los bioensayos pasivos fueron los primeros en usarse para describir el comportamiento de atracción; por lo tanto, se discute que son los que verdaderamente presentan una quimiotaxis y, además se ha comprobado que funcionan para insectos no voladores (Rust y Bell, 1976). Esto da a entender que los olfatómetros independientemente de si son activo o pasivo, un insecto, que puede someterse a ambos artefactos, presenta respuestas positivas a los estímulos. Lo anterior se pudo observar con los machos de *M. mexicanus*, a pesar de ser insectos voladores, mediante la respuesta positiva (taxia) hacia los extractos bacterianos de la misma especie.

Por todo lo anteriormente dicho, este trabajo se considera como el primero en demostrar un comportamiento de atracción de los machos hacia los volátiles producidos por bacterias aisladas de la cámara genital de Melolonthidae en un olfatómetro de cuatro vías en condiciones controladas.

En el sentido de la descripción de los patrones de los machos de *M. mexicanus*, en los coleópteros distribuidos en México solo se cuentan con dos trabajos de etogramas relacionados con el comportamiento precopulatorio y de actividad alimentaria (Romero-López y Arzuffi 2010; Morales-Blancas y Romero-López; 2019; Nieves-Silva y Romero-López 2019). En la literatura especializada se presenta un único trabajo que documenta un cambio de comportamiento en la

locomoción y alimentación por parte de individuos de *Euplates sp.* cuando existe un incremento de microorganismos, aunque no se incluyen los patrones y transiciones de comportamiento (Lawren y Snyder 1998). Por estas razones, los datos obtenidos en este trabajo son vanguardistas en describir los patrones y transiciones de las taxias de cualquier grupo de insectos, al ser expuesto a volátiles producidos por bacterias.

Con los resultados generados en este trabajo se puede sugerir una interacción entre los microorganismos y los adultos de *M. mexicanus* centrada en la producción de atrayentes sexuales y con esto cambia el esquema de comunicación química sexual de Melolonthidae mediante la adición de un posible nuevo elemento en la producción del mensaje, pero para determinar esto es necesario el desarrollo de más estudios que permitan la identificación de los volátiles microbianos y que esclarezcan la información sobre los posibles beneficios que le brinda el insecto a los microorganismos en el microhábitat de la cámara genital. Con base en ello y con una visión a mediano plazo, pueden proponerse estrategias de manejo para los adultos de esta especie mediante el empleo de los volátiles bacterianos de *M. mexicanus*, en trampas de alta especificidad.

Conclusiones

- Se aisló una colonia bacteriana con forma circular y elevación convexa con un margen entero, de color rosa-crema y tamaño de 1-2 mm de diámetro, en el interior de la cámara

genital de las hembras de *M. mexicanus*. No se encontraron bacterias en las glándulas accesorias.

- El olfatómetro de cuatro vías empleado en el presente estudio fue adecuado para evaluar las respuestas de los machos de *M. mexicanus* hacia extractos bacterianos, principalmente en términos de reducir riesgos a la salud del observador.
- Los extractos bacterianos provocaron un mayor número de respuestas positivas por parte de machos de *M. mexicanus*, en comparación con el medio Luria Bertani, en bioensayos con este olfatómetro. La frecuencia de dichas respuestas fue estadísticamente significativa con relación al control.
- Se observó una tendencia en respuestas positivas por parte de los machos de *M. mexicanus* hacia los extractos bacterianos de *M. mexicanus*, con respecto a los otros tratamientos bacterianos, también en el olfatómetro.

Literatura citada

Amat, G., Héctor, G., Gasca, J y Amat, E. (2005). Guía para la cría de escarabajos. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia.

Anaya, A. L., Espinosa-García, F. y Cruz-Ortega, R. (2001). Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. (Instituto de Ecología, Ed.) (Primera). México.

- Arce-Pérez, R. y Morón, M. A. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macrodactylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana*, 79: 123-239.
- Augusto, F. and Valente, A. L. P. (2002) Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 21(6-7): 428-438.
- Becher, P. G., Flick, G., Rozpedowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M. C., Hansson, B. S., Piškur, J., Witzgall, P. and Bengtsson, M. (2012) Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26: 822-828
- Baker, T. C. and Cardé, R. T. (1984). Technique for behavioral bioassays. In: *Techniques in pheromone research*. Hummel, H.E. and T.A. Miller (Eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 45-73.
- Benítez-Herrera, L. N. 2018. Histología de las estructuras potencialmente productoras de feromonas de *Cyclocephala lunulata* (Coleoptera: Melolonthidae). Montecillo, México. Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México, México.
- Benítez-Herrera, L. N., Martínez-M, I. y Romero-López, A. A. (2015). Anatomía del aparato reproductor de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y su

posible participación en su comunicación química sexual, 40(1): 189-198.

Chen, B., Beng-Soon, T., Sun, C., Hu, S., Lu, H., Boland, W. and Shao, Y. (2016)

Cherman, M. A. y Morón, M. A. (2014). Validación de la familia Melolonthidae. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1): 201-220. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 6(29505): 1-14

Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W. and Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 840-859.

Dicke, M. and Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2(2): 131-139.

Dillon, R. J. and Dillon V. M. (2004). The gut bacteria of insects. *Annual Review of Entomology*, 49: 71-92

Eberhard, W. G. (1992). Species isolation, genital mechanics, and the evolution of species-specific genitalia in three species of *Macrodactylus* beetles (Coleoptera, Scarabeidae, Melolonthinae). *Evolution*, 46(6): 1774-1783.

Ezenwa, V. O., Gerardo, N. M., Inouye, D. W., Medina, M. and Xavier, J. B. (2012) Animal behavior and the microbiome. *Science*, 338: 198-199 Fiedler, K., Schtz, E., and Geh, S. (2001).

- Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204(2): 111-121.
- Finch, S. (1986). Assessing host-plant finding by insects. In: *Insect-plant interactions*. J.R. Miller and T.A. Miller (Eds.). Springer-Verlag, New York Inc. pp. 23-63.
- French-Constant, R. H., Dowling, A. and Waterfield, N. R. (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, 49(4): 436-451.
- García-Canales, S. C. y Romero-López, A. A. (2017). Respuesta de machos *Macroductylus mexicanus* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae) en pruebas de olfatómetro y extracción de compuestos con posibles implicaciones químico-ecológicas. *Entomología mexicana*, 4: 443-449.
- González-Martínez, A. G. (2018). Obtención de código de barras de ADN del gen MT-COI de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series*, 41: 95-98.
- Hare, J. D. (1998). Bioassay methods with terrestrial invertebrates. In: *Methods in Chemical Ecology. Bioassay methods*. K. F. Haynes and J. G. Millar (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Chapman & Hall, USA. Vol. 2. pp. 212-270.

- Hernández, S. y Benz, B. (2004). Enemigos naturales de *Macrodactylus murinus* Bates (Coleoptera; Scarabaeidae) en San Miguel, Sierra de Manantlán, Jalisco, México. Avances en Investigación Agropecuaria, 1: 1-6.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M., and Fukatsu, T. (2008). Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biology letters*, 4(1): 45–48.
- Hoyt, C. P., Osborne, G. O. and Mulcock, A. P. (1971). Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature*, 230: 472-473.
- Jayo, M. J., y Cisneros, F. J. (2008). Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Institute of Laboratory Animal Resources. Academia Nacional de Medicina. National Academy Press, Washington, D.C., USA. Vol 8. pp. 1-135.
- Kim, J. Y. and Leal, W. S. (1999). Eversible pheromone gland in a melolonthin beetle, *Holotrichia parallela*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4): 825-833.
- Korpi, A., Jarnberg, J., and Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(2): 139-193.
- Lahitte, H. B. y Lázaro L. (2003). Sobre el etograma, 1: del etograma como lenguaje al lenguaje de los etogramas. *Revista de etiología*, 4 (2): 129-141.
- Leal, W. S. (1998). Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 39-61.

- Leroy, P. D., Sabri, A., Verheggen, F. J., Francis, F., Thonart, P. and Haubruge, E. (2011). The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. *Chemoecology*, 21(3): 113-122.
- Liu, J., Meng, Z., Liu, X. and Xiao-Hua, Z. (2019). Microbial assembly, interaction, functioning, activity and diversification: a review derived from community compositional data. *Marine Life Science & Technology*, 1: 112-128.
- López-Ávila, A., Rincón, D. F. (2006). Diseño de un olfatómetro de flujo de aire para medir respuestas olfativas de insectos de tamaño mediano y pequeño. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(1): 61-65
- Lu, L., Luo, T., Zhao, Y., Cai, C., Fu, Z. and Jin, Y. (2019). Interaction between microplastics and microorganism as well as gut microbiota: A consideration on environmental animal and human health. *Science of The Total Environment*,
- Marshall, D. G., Jackson, T. A., Unelius, C. R., Wee, S. L., Young, S. D., Townsend, R. J. and Suckling, D. M. (2016). *Morganella morganii* bacteria produces phenol as the sex pheromone of the New Zealand grass grub from tyrosine in the colleterial gland. *The Science of Nature*, 103(7-8): 59.
- Martin, P. and Batesson, P. (1986). *Measuring behavior: An introductory guide*. Cambridge: Cambridge University Press,

- Martínez, A. J., Robacker, D. C., Garcia, J. A. and Esau, K. L. (1994). Laboratory and field olfactory attraction of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to metabolites of bacterial species. *The Florida Entomologist*, 77(1): 117.
- Martínez-Bonilla, O. K., Romero-López, A. A. y Benítez-Herrera, L. N. (2015). Morfometría corporal y antenal *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y descripción de sus sensilas lamelares. *Boletín de La Sociedad Mexicana de Entomología*, 1: 81-87.
- Morales-Blancas, G. I. y Romero-López, A. A. (2019). Comportamiento de adultos de *Macroductylus mexicanus* Burmeister, 1855 (Coleoptera: Melolonthidae) en su acercamiento a árboles de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. 1892 (Fabaceae). *Entomología mexicana*, 6: 352-357.
- Morón, M. A. (1986). El género *Phyllophaga* en México, morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 19, Instituto de Ecología. México, D. F. 341 p.
- Morón, M. A., Nogueira, G., Rojas-Gómez, C. V., and Arce-Pérez, R. (2012). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 298-302.
- Nieves-Silva, E. y Romero-López A. A. (2017). Olfatómetro portátil para el estudio de interacciones entre “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) y plantas. *Entomología mexicana*, 3: 516-522.

- Nieves-Silva, E. y Romero-López, A. A. (2019). Perfil químico de volátiles de *Baccharis salicifolia* (Asteraceae) e interacción con *Macroductylus nigripes* (Coleoptera:Melolonthidae). *Acta Agronómica*, 68(3): 222-227.
- Nout, M. J. R. and Bartelt, R. J. (1998). Attraction of a flying nitidulid (*Carpophilus humeralis*) to volatiles produced by yeasts grown on sweet corn and a corn-based medium. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7): 1217-1239.
- Ochieng, S. a, Robbins, P. S., Roelofs, W. L. and Baker, T. C. (2002). Sex pheromone reception in the scarab beetle *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Physiology, Biochemistry, and Toxicology*, 95(1): 97-102.
- Ortega-Ojeda, C. A. (2005). Estudios metodológicos para evaluar el impacto económico de escarabajos Melolonthidae (Insecta: Coleoptera) en tres cultivos tropicales. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias en Fitoprotección. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador, pp. 109.
- Ortiz, M. I. and Molina, J. (2010). Preliminary evidence of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odour extracts. *Acta tropica*, 113(2): 174-179.
- Percy-Cunningham, J. E. and Macdonald, J. A. (1987). Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. *Pheromone Biochemistry*, 27-75.
- Pérez-Estrada, F. J., Rosete-Enríquez, M., Trujillo-Vélez M. R. y Romero-López A. A. (2020). Aparato reproductor de hembras de *Phyllophaga ravida* Blanchard, 1850 (Coleoptera:

- Melolonthidae) asociado con colonias bacterianas. *Entomología mexicana*, 7: 487-493.
- Perlmutter, J.I. and Bordenstein, S.R. (2020) Microorganisms in the reproductive tissues of arthropods. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 97–111
- Ramos-Santafe, N. C. (2013). Determinación taxonómica y evaluación del ciclo de vida del escarabajo defoliador (Coleoptera: Scarabaeidae) posible nueva plaga del *Theobroma cacao* en Doncello, Caquetá. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.
- Rivera-Orduña, F., González, E., Gómez, Z., López, N., Hernández-Rodríguez, C., Berkov, A. y Zúñiga, G. (2009). Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 325-342.
- Ruíz-Flores, Z., Reyes-Chilpa, R., Nájera-Rincón, M., Ortega-Hernández, A. y Romero-López, A. A. (2020). Patrones de comportamiento de larvas de *Phyllophaga vetula* Horn, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) ante estímulos alimentarios probados en laboratorio. *Entomología mexicana*, 7: 260-266.
- Robacker, D. C. and Moreno, D. S. (1995). Protein feeding attenuates attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to volatile bacterial metabolites. *The Florida Entomologist*, 78(1): 62.
- Romero-López, A. A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos

en México: a diez años de distancia. *Dugesiana*, 23(1): 59-73.

Romero-López, A. A. y R. Arzuffi. (2010). Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de un melolóntido mexicano. In: Rodríguez-del Bosque, L. A. y M. A. Morón (Eds.). *Ecología y Control de Plagas Edafícolas*. México.

Romero López, A. A., Arzuffi, R. y Morón, M. A. (2010). *Comunicación química sexual. Plagas del suelo* (Primera Edición). México: Mundi-Prensa.

Romero López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., Morón, M. A., Castrejón-Gómez, V. and Villalobos, F. J. (2004). Sensory Organs in the Antennae of *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6): 1306-1312.

Romero-López, A. A., Morón, M. A., and Valdez, J. (2010). Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravidata* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*, 39(6): 957-966.

Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., Sánchez-Espíndola, E. and Morón, M. A. (2011). Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 960-965

Rosete-Enríquez, M. and Romero-López, A. A. (2017). *Klebsiella* bacteria isolated from the genital chamber of *Phyllophaga obsoleta*. *Southwestern Entomologist*, 42(4): 1003-1014.

- Rust, M. K., and Bell, W. J. (1976). Chemo-anemotaxis: a behavioral response to sex pheromone in nonflying insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7): 2524-2526
- Schulz, S., and Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *The Royal Society of Chemistry*, 24(4): 814-842.
- Tada, S. and Leal, W. S. (1997). Localization and morphology of sex pheromone glands in scarab beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 23(4): 903-915.
- Thao, M. L. and Baumann, P. (2004). Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3401-3406.
- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., and Blomquist, G. J. (1999). Insect pheromones - An overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(6): 481-514.
- Todar, K. (2012). *Todar's online textbook of bacteriology*. Todar, K. (Ed). Madison, Wisconsin.
- Torto, B., Carroll, M. J., Duehl, A., Fombong, A. T., Katzav-Gozansky, T., Nazzi, F., Soroker, V. and Teal, P. (2013) Standard methods for chemical ecology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52 (4): 1-34.
- Trujillo-Vélez, M.R. (2017). Localización de sitios productores de infoquímicos en *Macroductylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae): evidencia morfológica y microbiológica. *Benemérita*

Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de licenciatura.

Vet, L. E., Lenteren, J. V., Heymans, M. and Meelis, E. (1983). An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, 8: 97-106.

Zarbin, P. H. G., Villar, J. A. F. P. and Correa, A. G. (2007). Insect pheromone synthesis in Brazil: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(6): 1100-1124.